Bildung aktiver Replicase nach zellfreier Translation der RNA des Coliphagen Qß

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt
von

MONIKA HAPPE
aus Detmold

1974

74 459

Bildung aktiver Replicase nach zellfreier Translation der RNA des Coliphagen Qß

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt

von

MONIKA HAPPE

aus Detmold

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 7. 1974

Dekan	Prof. Dr. D. Sperlich
1. Berichterstatter	Priv. Doz. Dr. H. Jockusch
2. Berichterstatter	Prof. Dr. W. Seyffert

aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Herrn Professor Dr. G. Melchers danke ich dafür, daß er es mir ermöglichte, diese Arbeit am Max-Planck-Institut für Biologie durchzuführen.

Herrn E. Freiberg danke ich für die Ausführung der Zeichnungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. H. Jockusch für seine hilfreiche Beratung bei der Durchführung der Experimente und für die kritische Diskussion des Manuskripts.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0086

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Bakterien und Bakteriophagen	4
2.2.	Medien	4
2.3.	Phagenreinigung	4
2.4.	RNA-Isolierung	5
2.5.	Herstellung ^{3}H-markierter QB-RNA	5
2.6.	Zellfreie Proteinsynthese	6
2.7.	Partielle Enzymreinigung	6
2.8.	Replicasetest	9
2.9.	Elektrophoretische Trennung von Mononukleotiden	11
2.10.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	12
2.11.	Radioaktivitätsbestimmung	13
2.12.	Chemikalien	14
3.	Ergebnisse	16
3.1.	Zellfreie Proteinsynthese	16
3.2.	In-vitro-Bildung von Replicase	17
3.3.	Partielle Enzymreinigung	22
3.4.	Matrizenspezifität der in-vitro-Replicase	27
3.5.	Enzymkinetische Untersuchungen	29
3.6.	Nachweis der α- und δ-Kette als Bestandteil in vitro gebildeter Replicase	31
3.7.	Charakterisierung des Produkts der enzymatischen Reaktion	36
3.8.	Assoziation der Replicaseuntereinheiten	41
4.	Diskussion	47
4.1.	Enzymatische Eigenschaften der in-vitro-Replicase	47
4.2.	Assoziation von Wirtsproteinen und R-Kette	48
4.3.	Ausbeute an funktionellem R-Protein unter verschiedenen Synthese- und Reinigungsbedingungen	50
5.	Zusammenfassung	52
	Abkürzungen	54
	Literatur	55

1. Einleitung

Die Replicase (RNA-abhängige RNA-Polymerase) des RNA-Phagen Qß ist ein Enzymkomplex, der sich aus vier nicht identischen Untereinheiten verschiedener genetischer Herkunft zusammensetzt (Kamen, 1970, Kondo, 1970). Nur das R-Protein (ß-Kette) wird vom Qß-Phagen codiert, die übrigen drei Polypeptidketten sind wirtscodierte Proteine. Sie wurden als Translationskontrollfaktor i (Groner et al., 1972) (α-Kette) und als Elongationsfaktoren der Proteinsynthese Tu (γ-Kette) und Ts (δ-Kette) identifiziert (Blumenthal et al., 1972).

Alle vier Untereinheiten sowie ein Wirtsfaktor HF I, der auch in uninfizierten Zellen vorkommt, werden für die Replikation von Qß-RNA benötigt (Franze de Fernandez et al., 1972, Eikhom und Spiegelman, 1967, Shapiro et al., 1968). Poly-rC, eine synthetische Matrize, die vom Enzym akzeptiert wird (Eikhom und Spiegelman, 1967), wird dagegen auch in Abwesenheit der α-Kette und des Wirtsfaktors repliziert (Kamen et al., 1972). Komplette und α-lose Replicase unterscheiden sich voneinander durch ihre Empfindlichkeit gegenüber hoher Ionenstärke (Kamen et al., 1972).

Die phagenspezifische Replicaseuntereinheit kann im zellfreien, Qß-RNA-stimulierten System synthetisiert werden (Jockusch et al., 1970, Jockusch und Hindennach, 1972). Da das R-Protein von den Produkten der zellfreien Translation der Qß-RNA den größten Histidingehalt aufweist (Garwes et al., 1969, Hindennach und Jockusch, 1974, Königsberg et al., 1970), ist die Verwendung dieser Aminosäure zur radioaktiven Markie-

rung besonders geeignet, wenn nur das R-Protein untersucht werden soll. In einem typischen Proteinsyntheseexperiment entfallen 40 % der eingebauten Radioaktivität auf das R-Protein, 10 % auf das Durchleseprodukt und die restlichen 50 % auf nicht authentische Produkte, wahrscheinlich N-terminale Fragmente der R-Kette.

Die Qß-Replicase ist wesentlich komplizierter aufgebaut als andere bereits in vitro synthetisierte phagenspezifische Enzyme (Herrlich und Schweiger, 1971, Salser et al., 1967). Im zellfreien System liegen jedoch Bedingungen vor, die die Replicasebildung begünstigen sollten. Es besteht eine enge räumliche Beziehung zwischen der entstehenden R-Kette und den an ihrer Synthese beteiligten Wirtsfaktoren, die als Replicaseuntereinheiten benötigt werden. Man könnte daher annehmen, daß der Enzymkomplex aus diesem Proteinsynthesekomplex hervorgeht. Außerdem ist es möglich, authentisches Enzym in die Komplexe $\alpha + \beta$ und $\gamma + \delta$ zu zerlegen und daraus aktives Enzym zu rekonstituieren (Kamen, 1970).

Die Assoziation der R-Kette mit den übrigen Replicaseuntereinheiten setzt die strukturelle und funktionelle Intaktheit des Proteins voraus. Mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß das R-Protein unter zellfreien Bedingungen in voller Länge synthetisiert wird (Hindennach und Jockusch, 1974, Jockusch et al., 1970, Horiuchi et al., 1971). Als Kriterium für die Funktionsfähigkeit kann die Bindung an Qß-RNA angesehen werden. Zentrifugationsexperimente ergaben, daß 7 - 10 % des R-Proteins an Qß-RNA binden (Jockusch et al., 1970).

Da Qß-Replicase durch einen Überschuß an Qß-RNA - auch im Poly-rC-abhängigen Test - gehemmt wird (Hori, 1973, Kondo und Weissmann, 1972), ist für den Nachweis von in-vitro-Replicaseaktivität die Entfernung der für die Proteinsynthese eingesetzten RNA erforderlich. Mit authentischer Replicase wurde gezeigt, daß eine partielle Reinigung des Enzyms im Mikromaßstab möglich ist. Anwendung des Reinigungsverfahrens auf die in vitro synthetisierten Proteine mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation ergab, daß 0,5 % des R-Proteins einen Komplex bilden, der mit ca. 7S sedimentiert (Happe, 1973). Dieser Sedimentationskoeffizient stimmt mit dem authentischer Replicase überein (Eikhom und Spiegelman, 1967).

Die Menge an 7S-Komplex im Gradienten, die man aus einem Milliliter Proteinsyntheseansatz erhält, entspricht 0.05 Enzymeinheiten. Sie läge damit 10 - 20fach über der Nachweisgrenze für Replicaseaktivität (Happe, 1973).

Die Suche nach in-vitro-Replicaseaktivität erschien unter diesen Voraussetzungen aussichtsreich.

In dieser Arbeit wurde die Entstehung aktiver Replicase unter zellfreien Bedingungen nachgewiesen. Ferner wurden die Eigenschaften der in-vitro-Replicase und der Mechanismus der Untereinheitenassoziation untersucht.

Über einen Teil der Ergebnisse wurde bereits berichtet (Happe und Jockusch, 1973 a und b, Jockusch et al., 1973)

2. Material und Methoden

2.1. Bakterien und Bakteriophagen

Die Stämme E. coli A 19 (RNaseI$^-$, met$^-$, tyr$^-$, lysogen für λ) und Q 13 (RNaseI$^-$, PNase$^-$, met$^-$, tyr$^-$, unbekanntes Wuchsstoffbedürfnis im synthetischen Medium, lysogen für λ) wurden im Labor von W. Gilbert, Biological Laboratories, Harvard University, isoliert.

Von E. coli Q 13 stammen die RNA-permeablen Mutanten HAK 8 und HAK 88 ab (isoliert von M. Kuwano, Kyushu University, Fukuowa, erhalten von M. Kondo, Universität Antwerpen). HAK 88 weist zusätzlich eine temperatursensitive Mutation des Proteinsynthese-Elongationsfaktors Ts auf.

Bakteriophagen: Qß Wildtyp und R 17 Wildtyp (Biophysics Laboratory, University Wisconsin).

2.2. Medien

MS-Medium für Phagenvermehrungen und Wachstum uninfizierter und infizierter Zellen enthielt 10 g Trypton, 1 g Hefeextrakt, 1 g Glucose und 8 g NaCl pro Liter. Für die Herstellung ^{3}H-markierter Qß-RNA wurde TPG-Medium nach Sinsheimer et al. (1962) verwendet, das zusätzlich die 20 Proteinaminosäuren in 0,2 mM Konzentration enthielt.

2.3. Phagenreinigung

Qß-Phagen wurden aus Lysaten (Happe, 1973) nach der Methode von Watanabe und August (1967) durch PEG-Dextransulfatfällung und anschließende CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gerei-

nigt. Da der Phage R 17 im Zweiphasensystem zerfällt, erfolgte die Reinigung hier durch Ammoniumsulfatfällung und Zentrifugation durch eine 10 %ige Sucroselösung auf einem CsCl-Sockel (Präparat von I. Hindennach).
8,07 OD_{260} ≙ 1 mg Qß-Phagen; 7,81 OD_{260} ≙ 1 mg R 17 Phagen.

2.4. RNA-Isolierung

Aus den gereinigten Phagen wurde die RNA nach der Phenolmethode (Gierer und Schramm, 1956) unter Zugabe von SDS extrahiert und dreimal mit Äthanol gefällt, um Phenolreste und SDS zu entfernen. Die Intaktheit der RNA wurde durch Elektrophorese (2 1/2 Stunden bei 50 V und 5 mA/Röhrchen) in 2,6 %igen Acrylamidgelen nach Loening (1967) überprüft. Die RNA-Menge wurde aus der optischen Dichte bei 260 nm ermittelt (23,5 OD_{260} ≙ 1 mg RNA). Das Molekulargewicht von Qß RNA beträgt $1,5 \times 10^6$ (Boedtker, 1971), das von R 17 RNA $1,2 \times 10^6$ (Enger et al., 1963).

TMV-RNA, Stamm Vulgare, nach der SDS-Phenolmethode hergestellt, aus Laborbeständen.

2.5. Herstellung ^{3}H-markierter Qß-RNA

15 Minuten nach Infektion mit dem Phagen Qß wurden zu einer 200 ml Kultur des E. coli Stammes A 19 in TPG-Medium 100 µl ^{3}H-Uridin (spez. Akt. 2,5 Ci/mMol; 100 µl ≙ $2,2 \times 10^8$ dpm) zugegeben. Nach Beginn der Lyse wurde bis zum Wiederanstieg der optischen Dichte inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt waren 98 % der eingesetzten Radioaktivität in säureunlösliches

Material eingebaut worden. Aus den im PEG-Dextransulfatsystem gereinigten Phagen ($2{,}2 \times 10^{13}$ pfu) wurden 200 µg ^{3}H-Uridin-markierte RNA mit einer spezifischen Aktivität von 2.5×10^{4} dpm/µg erhalten.

2.6. Zellfreie Proteinsynthese

Proteinsynthese im zellfreien System wurde nach Capecchi (1966) durchgeführt. Die S30-Konzentration wurde durch Vorversuche optimiert, wobei die Kinetik des Histidin-Einbaus als Kriterium diente (Jockusch et al., 1970).

Das zellfreie System war folgendermaßen zusammengesetzt: 75 mM NH_4Cl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM Mg-Acetat, 5 mM Phosphoenolpyruvat, 3 mM K_2-ATP, 0,2 mM Na_3-GTP, 10 mM ß-Mercaptoäthanol, 50 µg/ml t-RNA, 20 µg/ml Pyruvatkinase und 30.000 g-Zellextrakt in derjenigen Verdünnung, daß die Reaktionsmischung 2 - 3 mg/ml Ribosomen enthielt. Die 20 Proteinaminosäuren mit Ausnahme der zur Markierung verwendeten lagen in 0,08 mM Konzentration vor. Die Synthese wurde durch Zugabe von 300 µg/ml Qß-RNA gestartet und nach 30 Minuten durch Abkühlen auf 4 °C beendet. In Zeitintervallen von 5 - 10 Minuten wurden 10 µl-Proben entnommen, auf Papierfilter pipettiert und einer heißen TCA-Behandlung unterworfen (Mans und Novelli, 1961).

2.7. Partielle Enzymreinigung

Die Isolierung der Qß-Replicase erfolgte in dieser Arbeit modifiziert nach Eoyang und August (1968). Diese Methode weist gegenüber der früher angegebenen (Happe, 1973) den Vorteil auf, daß sie besser auf ein kleines Volumen (≙ 1,0 ml)

anwendbar ist und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Alle Arbeitsgänge wurden bei 4 °C durchgeführt.

Lösungen

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM Mg-Acetat, 1 mM EDTA, 1 mM ß-Mercaptoäthanol, 20 % Glycerin (w/v).

Puffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM Mg-Acetat, 1 mM EDTA, 0.2 M $(NH_4)_2SO_4$, 1 mM ß-Mercaptoäthanol.

Puffer C: wie Puffer B, jedoch 1,2 M $(NH_4)_2SO_4$.

Dextranlösung: 20 % (w/w)

PEG-Lösung: 30 % (w/w)

Rohextrakt (I)

1 g gefrorene QB-infizierte Zellen (Happe, 1973) wurden mit 2,5 g gewaschenem Aluminiumoxid 10 Minuten im Mörser zerrieben. Unter allmählicher Zugabe von 2,0 ml Puffer A und 20 µl 0,1 %iger DNaselösung wurde die Paste suspendiert und nach 15 Minuten bei 30.000 g zentrifugiert.

PEG-Dextran-Phasenverteilung

Zu 1 ml Rohextrakt bzw. 1 ml in-vitro-Ansatz nach Syntheseende wurden 310 µl PEG-Lösung, 120 µl Dextranlösung und 330 mg NaCl zugegeben. Nach 15 Minuten Rühren wurde bei 10.000 g 10 Minuten zentrifugiert und die Oberphase (II, 1,0 ml) vier Stunden gegen Puffer A dialysiert.

Ammoniumsulfatfällung

Unter allmählicher Zugabe von 200 mg/ml festem $(NH_4)_2SO_4$ wurde die dialysierte Oberphase (1,0 ml) auf 35% Sättigung gebracht und 5 Minuten bei 10.000 g zentrifug ert. Die dextranreiche Oberphase (III', ca. 200 µl) wurde verworfen,

die Unterphase (III, ca. 800 µl) mit 120 mg/ml $(NH_4)_2SO_4$ versetzt und nach 20 Minuten Stehen im Eisbad 15 Minuten bei 30.000 g zentrifugiert. Bei Verwendung des Enzyms für Gradientenzentrifugation wurde das Sediment in 100 µl Puffer B gelöst und zwei Stunden gegen diesen Puffer dialysiert. Sollten die enzymatischen Eigenschaften direkt nach diesem Reinigungsschritt getestet werden, so wurde gegen Puffer A dialysiert, da Ammoniumsulfat die Replicase stark hemmt (50% Hemmung durch 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$).

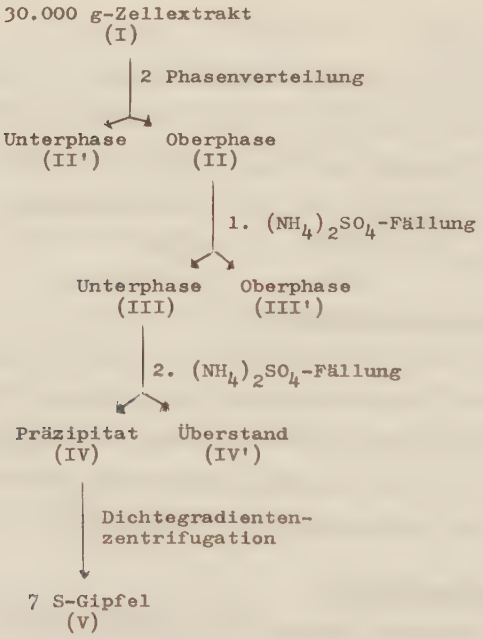

Abb. 1: Reinigungsschema für Qß-Replicase

Dichtegradientenzentrifugation

200 µl des partiell gereinigten Enzyms (IV) wurden auf einen linearen Glyceringradienten (10 - 30 % Glycerin in Puffer B), dessen Volumen 5,2 ml betrug, aufgetragen und 16 Stunden bei einer mittleren g-Zahl von 200.000 (48.000 rpm in der Beckman Spinco L 2, Rotor SW 65 K) zentrifugiert. Als Sedimentationsmarker wurden Katalase und Hämoglobin (aus Kaninchenblut) verwendet. Die Gradienten wurden mit einem Isco-Gerät vom Meniskus her fraktioniert und in 32 Fraktionen à 9 Tropfen (≙ ca. 150 µl) aufgefangen.

Bei Verwendung radioaktiv markierter Proteine wurde nach jedem Reinigungsschritt ein Aliquot entnommen und die Verteilung der Radioaktivität nach heißer TCA-Behandlung und SDS-Gelelektrophorese verfolgt.

2.8. Replicasetest

Für den Nachweis von Replicaseaktivität wurde ein vereinfachter Standardtest durchgeführt. Er beruht auf der faktorunabhängigen Synthese von Poly-rG an einer Poly-rC-Matrize (Gupta, 1972, Kamen, 1972). Der Testansatz enthielt:

50 mM Tris-HCl. pH 7,5, 10 mM Mg-Acetat, 0,8 mM Na_3-GTP, 14 mM ß-Mercaptoäthanol, 4 µg/ml Pyruvatkinase, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 48 µg/ml Poly-rC, 25 µg/ml Rifampicin, 10% Glycerin (w/v) und 5-25 µCi/ml ^{3}H-GTP oder 25-125 µCi/ml ^{32}P-GTP (bei 4 °C abgedampft und im gleichen Volumen bidestilliertem Wasser aufgenommen). Der pH-Wert des Tris-Puffers wurde nach Zugabe des Glycerins eingestellt. Das Rifam-

picin dient hierbei zur Unterdrückung Poly-rC-abhängiger GTP-Polymerisation durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase von E. coli.

Für Versuche, in denen die Matrizenspezifität des Enzyms untersucht oder das Produkt der enzymatischen Reaktion charakterisiert werden sollte, wurde der Standardtest modifiziert. Als Matrize wurde Qß-, R 17- oder TMV-RNA in einer Konzentration von 0,3 µg/ml eingesetzt (Kondo und Weissmann, 1972). Außerdem war die Testlösung 0,2 mM an allen vier Triphosphaten. Der für die Replikation von Qß-Plussträngen erforderliche Wirtsfaktor HF I brauchte in den meisten Fällen nicht zugegeben zu werden, da er durch das in dieser Arbeit angewandte Reinigungsverfahren nicht vom Enzym abgetrennt wird. 5 µg HF I (Phosphocellulosefraktion, von C. Weissmann erhalten) wurden für den Replicasetest mit Glyceringradientenfraktionen eingesetzt.

202 µl-Ansätze (2 Minuten bei 30 °C vorinkubiert) wurden nach Hinzufügen von 10 - 65 µl Enzymlösung 10 Minuten bei 30 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2,0 ml kalter TCA-Lösung wurde die Reaktion beendet. In den Nullwert wurde die Enzymlösung gleichzeitig mit der TCA-Lösung einpipettiert.

Wegen der hohen Proteinkonzentration partiell gereinigter Enzymlösungen wurde kein Filtertest sondern eine Flüssigkeitszählung durchgeführt. Der Nullwert konnte so auf 5% des Meßwertes gesenkt werden.

Das mit TCA gefällte Material wurde in der Christzentrifuge

10 Minuten auf Stufe 10 abzentrifugiert, in 0,5 ml 6 M Harnstoff, 0,1 % SDS gewaschen und erneut ausgefällt und gewaschen wie oben. Nach dreimaligem Waschen wurde das Sediment in 0,1 ml 4 N NH_3-Lösung aufgenommen und nach Zugabe von 1,0 ml Hyamin eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Zur Radioaktivitätsbestimmung wurde die Lösung mit 10 ml "4:1 Scintillator" in Scintillationsgläser übergespült.

Für die Charakterisierung des Produkts der enzymatischen Reaktion wurde die Probe nach der 4. TCA-Fällung in 200 µl 0,1 M Tris-Puffer aufgenommen und drei Stunden gegen 20 mM Tris-Puffer, der 3 mM an EDTA und 0,1 %ig an SDS war dialysiert. Nach Zugabe von 120 µg Qß-RNA als Träger wurde wie unter 2.4. beschrieben phenolisiert und die ausgefällte RNA in 20 µl H_2O aufgenommen.

Eine Einheit mit Poly-rC als Matrize ist definiert als 1 nMol GMP-Einbau in 10 Minuten bei 30 °C (Kamen, 1972). In dieser Arbeit wurde auch der Qß-RNA-abhängige Test bei 30 °C durchgeführt. In diesem Fall sind die Einheiten für beide Tests identisch.

2.9. Elektrophoretische Trennung von Mononukleotiden

Aus dem Replicase-Testansatz isolierte α-^{32}P-GMP-markierte RNA wurde mit T1/T2-RNase verdaut (Mundry und Priess, 1972). 10 µl Lösung wurden auf eine mit Cellulose beschichtete Plastikplatte (20 x 20 cm, mit Fluoreszenzindikator) aufgetragen und im Hochspannungsfeld (100 Volt/cm x Stunde) unter Varsolkühlung aufgetrennt (Mundry und Priess, 1972).

Nach Trocknen im warmen Luftstrom wurden die Platten 1o Stunden je 1.000 dpm exponiert (Kodak Royal Blue RB 54 Röntgenfilm). Zur quantitativen Auswertung wurde die Schwärzung des Röntgenfilms als Funktion der Wanderstrecke im Joyce Loebl Microdensitometer gemessen. Die Flächen unter den Absorptionsgipfeln der Kurven wurden durch Wägung bestimmt.

2.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Radioaktiv markierte Proteine: Nach RNase-Verdauung, Dissoziation und Reduktion der Proben (Jockusch et al., 1970) wurde gegen 6 M Harnstoff, 0,1 % SDS, 10 % (w/v) Rohrzucker und 1 % ß-Mercaptoäthanol dialysiert um uneingebaute Aminosäuren zu entfernen. Dabei wurde auch die Dichte der Proben erhöht und das Volumen etwas verringert. 100 - 200 µl Proben wurden auf 10 %ige SDS-Harnstoff-Polyacrylamid-Gele mit 0.5% Quervernetzer (modifiziert nach Maizel (1969)) aufgetragen (80 mm Länge, 6 mm Durchmesser, Puffer 0,1 M PO_4^{3-}, 0,1 % SDS, 6 M Harnstoff) und bei Raumtemperatur 13 Stunden bei 30 V und 6 mA/Röhrchen aufgetrennt. Die Gele wurden durch ein feines Drahtnetz gequetscht und so in 40 Fraktionen à 2 mm Länge unterteilt. Nach vier Stunden Erwärmen auf 60 °C mit 0,3 ml 0,1 %iger SDS-Lösung wurde die Radioaktivität der eluierten Proteine in 10 ml 1:1 Scintillator oder Toluolscintillator mit 8 % BBS 3 bestimmt.

Radioaktiv markierte RNA: Polyacrylamid-Gelelektrophorese ^{32}P-markierter RNA wurde nach Loening in 2,6 %igen Gelen (6 x 100 mm) durchgeführt. Die Laufzeit betrug 3 Stunden bei 50 V und 5 mA/Röhrchen. Die Position von Marker-RNA

(t-RNA, Qß-RNA) wurde im Joyce Loebl Chromoscan ermittelt. Die Gele mit radioaktivem Material wurden bei - 20 °C eingefroren und anschließend mit einem Mickel Gel Slicer in 2 mm dicke Scheiben fraktioniert. Die Gelstücke wurden zur Bestimmung der Radioaktivität in 1,0 ml Wasser überführt (Cerenkov-Zählung).

2.11. Radioaktivitätsbestimmung

Alle Proben wurden im Beckman LS 230 Liquid Scintillation Counter gezählt, ^{3}H-Proben in Scintillator und ^{32}P-Proben in Wasser mit fixiertem ^{3}H-Fenster, ^{32}P-Proben in Scintillator mit fixiertem ^{32}P-Fenster.

Papierfilter: Getrocknete Papierfilter wurden in 100 % Toluolscintillator (4 g PPO und 0,5 g POPOP/L Toluol) mit einer Zählausbeute von ca. 15 % für ^{3}H-Markierungen gezählt. Bei gleicher chemischer Zusammensetzung der Proben ist die Zählausbeute hinreichend konstant. Sie wurde mit ^{3}H-markierten Proteinen im Vergleich mit Flüssigkeitsscintillationszählung ermittelt.

Gelfraktionen: Gelfraktionen wurden in 100 % Toluolscintillator unter Zusatz von a) 8 % BBS 3 zur Wasseraufnahme oder, b) bei ausreichender Radioaktivität der Proben (20.000 dpm/Gel), in einem 1:1 Gemisch aus Toluolscintillator und Äthylenglykol gezählt. Die mit ^{3}H-markierten Proteinen als innerem Standard bestimmte Zählausbeute betrug 33 (a) bzw. 13 % (b).

Enzymtest: Die Scintillatorlösung bestand aus vier Teilen

Toluolscintillator und einem Teil Äthylenglykol (4:1 Scintillator). Als Zählausbeute wurden mit ^{3}H-GTP und ^{32}P-GTP als innerem Standard 25 und 80 % erhalten.

Bei den für Filter- und Enzymtests ermittelten Werten wurden Blindwerte von 50 - 100 bzw. 50 - 150 cpm/Probe bei der Tabellen- oder Kurvendarstellung abgezogen.

2.12. Chemikalien

Enzyme: Desoxyribonuklease (EC 3.1.4.5), Worthington (Freehold, N.J.), Katalse (EC 1.11.1.6), Serva (Heidelberg), Lysozym (EC 3.2.1.17), Boehringer (Mannheim), Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40), Boehringer (Mannheim), Ribonuklease A (EC 2.7.7.16), Serva (Heidelberg), Ribonuklease T1 (EC 2.7.7.26), Sankyo (Tokio), Ribonuklease T2 (EC 2.7.7.17), von K.W. Mundry erhalten..

Radiochemikalien: ^{3}H-Guanosintriphosphat (2Ci/mMol), α-^{32}P-Guanosintriphosphat (500 - 3.000 mCi/mMol), ^{3}H-Histidin (56 Ci/mMol) und ^{3}H-Uridin (2,5 Ci/mMol) wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, England bezogen, ^{3}H-Histidin (5 Ci/mMol) und ^{14}C-Histidin (256 mCi/mMol) von Schwarz / Mann.

Sonstige Chemikalien: Adenosintriphosphat (K_2-Salz), Calbiochem (Los Angeles, Californien), Guanosintriphosphat (Na_3-Salz), Boehringer, (Mannheim), Phosphoenolpyruvat (Na_3-Salz), Calbiochem (Los Angeles, Californien), Poly-rC (ca. 6S), Boehringer (Mannheim), Rifampicin, Geschenk der Ciba Gesellschaft (Wehr, Baden), tRNA, E. coli B, Schwarz

(Orangeburg, N.Y.), Hyamin, Packard (Illinois), Dextran 500, Serva (Heidelberg), Polyäthylenglykol, Serva, (Heidelberg).

3. Ergebnisse

3.1. Zellfreie Proteinsynthese

Die zellfreie Translation von QB-RNA wurde durch Parallelansätze mit ^{3}H-markiertem Histidin kontrolliert. In Abb. 2 I ist das Proteinmuster, das sich nach SDS-Gelelektrophorese einer solchen Probe ergibt, dargestellt. In Übereinstimmung mit dem elektrophoretischen Verhalten markierter in-vivo-Produkte (Garwes et al., 1969, Jockusch et al., 1970) und durch andere Aminosäuren markierter in-vitro-Produkte (Jockusch et al., 1970) wurde eine elektrophoretische Beweglichkeit relativ zum Farbstoff Bromphenolblau, "r_{BPB}", von 0,25 für das R-Protein bzw. 0,375 für das Durchleseprodukt ermittelt. Der r_{BPB}-Wert diente in weiteren Versuchen zur Identifizierung der Produkte.

Die je Milliliter in-vitro-Ansatz synthetisierte Menge R-Protein (R_s) wurde aus der Radioaktivität des R-Gipfels nach folgender Formel berechnet:

$$R_s = \frac{r}{s \cdot \eta \cdot n \cdot V} \left[\frac{pMol}{ml}\right] \quad (1)$$

s [µCi/pMol] = spezifische Aktivität von ^{3}H-Histidin eingestellt auf 5 µCi/pMol

n [1] = Zahl der Histidinreste pro R-Kette = 8

η [1] = Zählausbeute für ^{3}H-Markierung = 33% in 8% BBS 3

r [cpm] = Radioaktivität des R-Gipfels

V [ml] = Volumen der Probe

Der provisorische Wert n = 8 war aus Fingerprints tryptischer Peptide für das Qß-RNA-abhängige Produkt ermittelt worden (Hindennach und Jockusch, 1974). Für das R 17-RNA-abhängige Produkt liegt ein solcher Wert nicht vor. In Tabelle 1 ist daher statt pMol R-Protein pMol Histidin in R-Protein eingebaut angegeben.

3.2. In-vitro-Bildung von Replicase

Um den Überschuß an Qß-RNA, der für die Proteinsynthese eingesetzt wird, zu entfernen, wurden die in-vitro-Produkte nach der gleichen Methode gereinigt, die für Qß-Replicase aus infizierten Zellen angewandt wird (s. 3.3.). Die so erhaltene Proteinlösung wurde auf Qß-Replicaseaktivität getestet. Tabelle 1 zeigt die Abhängigkeit des Auftretens von Replicaseaktivität von vorangehender Qß-RNA-stimulierter Proteinsynthese. Erfolgte die Synthese in Abwesenheit von Qß-RNA oder in Gegenwart von Puromycin, so konnte im nachfolgenden Test keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Weitere Kontrollexperimente wurden mit TMV- und R 17-RNA durchgeführt. Obwohl an R 17-RNA unter der Annahme des gleichen Histidingehaltes mehr R-Protein synthetisiert wurde als an Qß-RNA, erfolgte keine Replikation von Qß-RNA im anschließenden Enzymtest. Dies war zu erwarten, da R 17-Replicase Qß-RNA nicht akzeptiert. Da hochgereinigte Replicase der Phagen der R 17-Gruppe jedoch selbst an der homohogen RNA inaktiv ist (Fedoroff und Zinder, 1971), wurde zusätzlich untersucht, ob unter den vorliegenden Versuchsbedingungen aktive R 17-Replicase gebildet wird. Dies ist

Experiment Nr.	Inkubations-zeit (min)	Bedingungen während der Proteinsynthese		pMol R-Protein synthetisiert	pMol GMP eingebaut	Matrize
1	30	+ Qß-RNA,	t = 0'	38.5	51.0	poly-rC
2	30	+ Qß-RNA,	t = 0'	27.0	54.9	poly-rC
			t =30'	< 1.0	< 1.0	
3	20	5×10^{-5} Puromycin				
			t = 0'	< 1.0	< 1.0	
			t =20'	18.0	41.9	poly-rC
4	30	+ Qß-RNA,	t = 0'	45.0	42.7	poly-rC
		+ TMV-RNA,	t = 0'	-	< 1.0	
5	30	+ Qß-RNA,	t = 0'	344.0*	36.4	Qß-RNA
		+ R17-RNA,	t = 0'	26.0	< 1.0	
6	30	+ Qß-RNA,	t = 0'	-	40.1	Qß-RNA
		+ R17-RNA	t = 0'	-	3.6	R17-RNA
		+ R17-RNA	t = 0'	-	11.2	poly-rC

* pMol Histidin eingebaut in R-Protein

Tabelle 1: Abhängigkeit des Auftretens von Replicaseaktivität von vorangehender Proteinsynthese (z. T. aus Happe und Jockusch (1973 a))

tatsächlich der Fall (Tab. 1, Exp. 6).

Aus Vorversuchen mit authentischer R 17-Replicase war bekannt, daß nach dem in dieser Arbeit angewandten Verfahren partiell gereinigtes Enzym mit R 17-RNA als Matrize eine geringere Aktivität aufweist als mit Poly-rC. Das gleiche Verhalten zeigte die in vitro synthetisierte R 17-Replicase.

Auf der Basis der spezifischen Aktivität hochgereinigter Qß-Replicase kann der Anteil R-Protein (R_a), der aktives Enzym bildet, berechnet werden.

$$R_a = \frac{A}{A_s \cdot MG_R \cdot R_s} = 0{,}005 - 0{,}01 \qquad (2)$$

R_s [pMol] = synthetisierte Menge R-Protein

MG_R [µg/pMol] = Gewicht eines pMol Replicase = 0,22µg

A [U] = Replicaseeinheiten im Aktivitätstest

A_s [U/µg] = Spezifische Aktivität gereinigter Replicase im Poly-rC-Test = 3U/µg (Kamen, 1972)

In Zentrifugationsexperimenten konnte gezeigt werden, daß nur ca. 10 % des zellfrei synthetisierten R-Proteins an Qß-RNA binden. Hiervon bilden wiederum nur 5 - 10 % aktive Replicase. Um diese niedrige Ausbeute an aktiver Replicase zu erhöhen wurde versucht, die Synthesebedingungen zu verbessern.

Während der Proteinsynthese laufen zwei temperaturabhängige Prozesse an der R-Kette ab, die Ausbildung der Se-

kundär- und Tertiärstruktur und die Denaturierung des Moleküls. Durch Senkung der Synthesetemperatur auf 30 bzw. 25 °C sollte untersucht werden, ob sich das Gleichgewicht zwischen beiden Vorgängen zugunsten der korrekten Faltung des Proteins verschieben läßt. Eine weitere Ursache für den geringen Bruchteil an nativem R-Protein könnte die Anwesenheit der N-terminalen Formylmethionylgruppe in der R-Kette sein. Da das abspaltende Enzym durch ß-Mercaptoäthanol gehemmt wird (Adams, 1968, Ball und Kaesberg, 1973), wurde in Experiment 9 die Proteinsynthese in Abwesenheit dieser Substanz durchgeführt. Um auch den Einfluß des im Zellextrakt vorhandenen ß-Mercaptoäthanols auszuschließen, wurde für Experiment 10 der Zellextrakt unter Stickstoffatmosphäre hergestellt.

Für die Experimente 7-9 wurden ^{14}C-Histidin-markierte in-vitro-Proben wie unter 2.7. beschrieben zentrifugiert und der Proteinanteil mit einem Sedimentationskoeffizienten < 15 S bestimmt. Tabelle 2 zeigt, daß die Synthese von R-Protein durch Senkung der Synthesetemperatur oder der ß-Mercaptoäthanolkonzentration gesteigert werden konnte. Zugleich nahm aber der Anteil an Proteinen mit einem Sedimentationskoeffizienten > 15 S oder an R-Fragmenten (aus SDS-Gelen ermittelt) zu.

In Experiment 10 wurde für die Proteinsynthese ß-Mercaptoäthanolfreier Zellextrakt verwendet. Auch hier wurde die R-Protein-Synthese unerwarteterweise gesteigert, die spezifische Aktivität der in-vitro-Replicase sank jedoch

auf 32 % der Kontrolle ab.

Exp.Nr.	Synthesebedingungen	pMol R-Protein synthetisiert	< 15 S (%)
7	t = 35 °C	12,8	25
	t = 30 °C	22,5	20
8	t = 35 °C	9,6	25
	t = 25 °C	5,2	25 *
9	+ ß-ME } 30°C	9,8	20
	o ß-ME } 30°C	16,0	20 *

Tab. 2: Sedimentationsverhalten ^{14}C-Histidin-markierter in-vitro-Produkte in Abhängigkeit von den Synthesebedingungen. *vermehrte Synthese von Proteinfragmenten.

Exp.Nr.	Synthesebedingungen	pMol R-Protein synthetisiert	pMol GMP eingebaut im Replicasetest
10	ß-ME-S30	13,2	92,0
	N_2-S30	51,0	100,0
11	10mM Mg^{++}	20,0	32,0
	15mM Mg^{++}	25.2	23,5

Tab. 3: Aktivität von in-vitro-Replicase in Abhängigkeit von den Bedingungen bei der Proteinsynthese

Der Einfluß der Magnesiumkonzentration im zellfreien System auf die Synthese von R-Protein und dessen Aktivität wurde in Experiment 11 untersucht. Die optimale Konzentration für die Initiation der Synthese liegt bei 4 - 6 mM Magnesium (Clark et al., 1970), für die Elongation dagegen bei

14 - 18 mM Magnesium (Szer und Ochoa, 1964). Deshalb wurde die Proteinsynthese bei 15 statt 10 mM Magnesiumacetat durchgeführt. Mit f 2-RNA konnte gezeigt werden, daß unter diesen Bedingungen die Synthese von R-Protein stark zunimmt (Zagorski et al., 1972). Die vermehrte R-Protein-Synthese wurde auch mit Qß-RNA gefunden, war aber mit einer Abhnahme der spezifischen Aktivität auf 59 % der Kontrolle verbunden. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, daß bei höherer Magnesiumkonzentration zwar komplette Polypeptidketten synthetisiert werden, daß die Primärstruktur jedoch fehlerhaft ist.

3.3. Partielle Enzymreinigung

Bei der partiellen Reinigung der in-vitro-Replicase wurde die Verteilung des radioaktiv markierten R-Proteins durch SDS-Gelelektrophorese verfolgt. Ein Enzymtest konnte wegen des hohen RNA-Gehalts in Stufe I und wegen der geringen Replicasekonzentration und der Anwesenheit der Polymeren in den übrigen Reinigungsstufen nicht durchgeführt werden. In Abb. 2 sind die Proteinmuster aus den Reinigungsschritten I, II, III' und IV dargestellt. Da die Radioaktivitätswerte auf 1 ml Ansatz normiert sind, kann die Ausbeute an R-Protein direkt aus der Fläche unter dem R-Gipfel entnommen werden. Der verlustreichste Schritt bei der Reinigung war die erste Ammoniumsulfatfällung. Die stark viskose, dextranreiche Oberphase machte zwar nur 1/5 des Gesamtvolumens aus, nahm jedoch 90 % des vor der Fällung vorhandenen R-Proteins auf. Das Präzipitat der zweiten Fällung

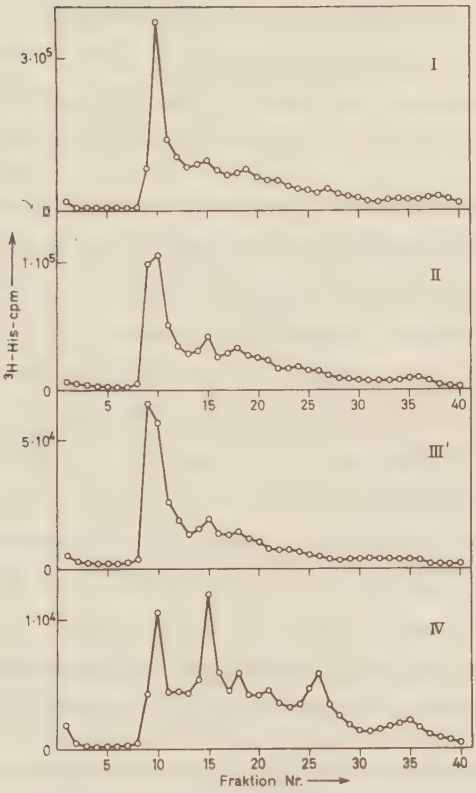

Abb. 2: Verteilung von Histidin-markierten in-vitro-Produkten bei der partiellen Replicasereinigung. Die Produkte wurden mit ^{3}H-Histidin (spez. Akt. 5 Ci/mMol) markiert und nach Syntheseende im PEG-Dextran-System gereinigt. Elektrophorese der Probe II' entfiel wegen des hohen Salz- und Polymerengehalts, die der Probe IV' wegen des niedrigen Gehaltes an markierten Proteinen. Alle Werte sind auf 1 ml Proteinsyntheseansatz normiert (unterschiedlicher Ordinatenmaßstab).
Fraktion 10 ≙ R-Protein, Fraktion 15 ≙ Durchleseprodukt. Bromphenolblau-Marker ≙ Fraktion 41..

enthielt 2,5 % des synthetisierten R-Proteins. Mit authentischer Replicase wurde für die Reinigung bis zum Ammoniumsulfatpräzipitat eine Ausbeute von 10 % ermittelt. Bei der zweiten Phasentrennung gehen 80 % der Aktivität verloren.

Die bis zum Glyceringradienten in der Enzympräparation enthaltene DNA-abhängige RNA-Polymerase, die ebenfalls Poly-rC als Matrize verwenden kann, wird durch das Antibiotikum Rifampicin gehemmt (Fromageot und Zinder, 1968, Hartmann et al., 1965). Durch einen Vergleich der Aktivität von Extrakten aus uninfizierten und infizierten Zellen wurde nachgewiesen, daß diese Hemmung so vollständig ist, daß selbst eine geringe Replicaseaktivität neben der E. coli Polymerase meßbar ist (Happe, 1973). Durch Weglassen des Rifampicins aus dem Enzymtest wurde der Gehalt an DNA-abhängiger RNA-Polymerase überprüft. Der GMP-Einbau stieg in Abwesenheit des Antibiotikums von 44,8 auf 58,2 pMol an, die DNA-abhängige RNA-Polymerase macht also nur 25 % der Aktivität an Poly-rC aus.

Die spezifische enzymatische Aktivität partiell gereinigter in-vitro-Replicase wurde unter Verwendung des 7S-Gipfels aus Glyceringradienten bestimmt. Hierzu wurde die Ammoniumsulfatfraktion ^{3}H-Histidin-markierter in-vitro-Produkte, unmarkierter in-vitro-Produkte und authentischer Replicase durch 10 - 30 %ige Glyceringradienten zentrifugiert. Die Fraktionen 9 - 12, 13 - 16 und 17 - 20 (Abb. 3) aus dem Gradienten mit unmarkierten in-vitro-Produkten wurden vereinigt und das Protein nach Zugabe von 100 µg E. coli Q 13 S 100 (RNA- und RNasearme DEAE-Cellulose-Fraktion nach Traub und Zillig (1966) , Präparat von I. Hindennach) als Träger

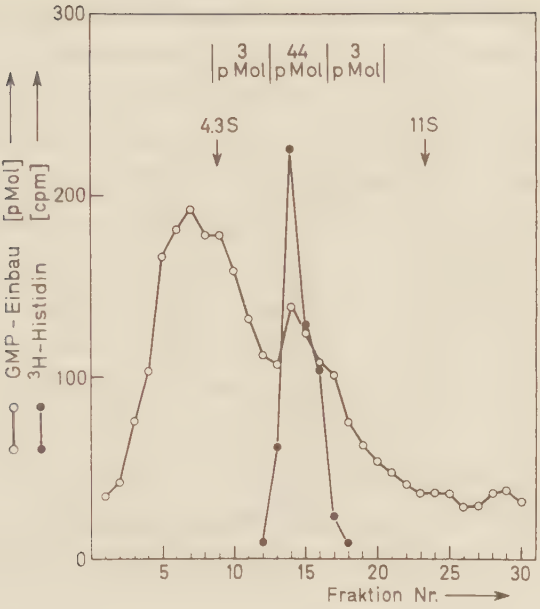

Abb. 3: Bestimmung des Sedimentationsverhaltens von in-vitro-Replicase (äus Happe und Jockusch, 1973a) 10 - 30 %ige Glyceringradienten in Puffer B wurden 16 Stunden bei 48.000 rpm in der Beckman Spinco L 2 (Rotor SW 65 K) zentrifugiert. Die Fraktionierung erfolgte vom Meniskus her (32 x 155 µl). Die Position der Markersubstanzen Hämoglobin (4,3S) und Katalase (11S) wurde in einem Parallelexperiment ermittelt.

o——o ^{3}H-Histidin-markierte Proteine aus 0,3 ml in-vitro-Ansatz

●——● Aktivität authentischer Replicase

Die Aktivität der unmarkierten in-vitro-Replicase ist oberhalb der Kurve zwischen den senkrechten Strichen (vereinigte Fraktionen) angegeben.

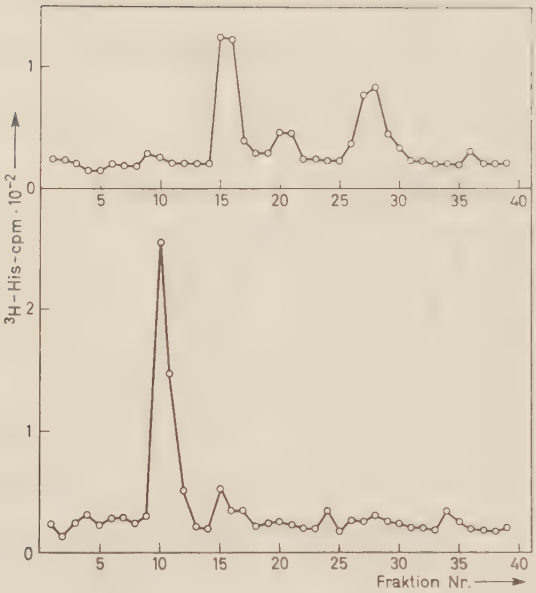

Abb. 4: Proteinmuster der Fraktionen 9 - 12 und 13 - 16 des Gradienten mit ^{3}H-Histidin-markierten in-vitro-Produkten (Abb. 3).
Für die SDS-Gelelektrophorese wurde 1/3 des Gesamtvolumens eingesetzt. Position von Bromphenolblau = Fraktion 41..

mit $(NH_4)_2SO_4$ ausgefällt. Der im anschließenden Enzymtest ermittelte GMP-Einbau ist in Abb. 3 oberhalb der Kurve angegeben. Die senkrechten Striche zeigen an, welche Fraktionen zum Aktivitätstest vereinigt wurden. Abb. 3 zeigt, daß die in-vitro-Aktivität bei 7 S (≙ Fraktion 13-16) gefunden wurde und somit mit authentischer Replicase cosedimentiert.

Die Proteine der Fraktionen 9 - 12 und 13 - 16 des Gradienten mit ^{3}H-Histidin-markierten in-vitro-Produkten wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Abb. 4 zeigt, daß der 7S-Gipfel fast ausschließlich aus R-Protein besteht, der 4S-Gipfel dagegen kein intaktes R-Protein enthält sondern nur R-Fragmente und Durchleseprodukt. Der nach Gleichung (2) berechnete Gehalt des 7S-Gipfels an R-Protein beträgt 0,08 pMol (≙ 0,018 µg Replicase). Unter Berücksichtigung des Verlusts von ca. 10 % bei der $(NH_4)_2SO_4$-Fällung für die Aktivitätsbestimmung wären damit beim GMP-Einbau 0,015 µg Replicase eingesetzt worden. Aus diesen Werten ergibt sich eine spezifische Aktivität von 2,4 U/µg, das sind 80 % der spezifischen Aktivität authentischer Replicase.

3.4. Matrizenspezifität der in-vitro-Replicase

Voraussetzung für die Untersuchung der Matrizenspezifität war eine möglichst vollständige Entfernung der für die Proteinsynthese eingesetzten Qß-RNA. Das Verhalten der RNA bei der Reinigung wurde durch Zugabe von ^{3}H-markierter Qß-RNA ($2,5 \times 10^5$ dpm ≙ 100%) zusätzlich zur unmarkierten RNA zu einem 1 ml Ansatz überprüft. Nach Inkubation mit unmarkierten Aminosäuren unter Standardbedingungen und Reinigung auf Replicase war in Stufe IV keine Radioaktivität mehr nachweisbar. Daraus folgt, daß weniger als 0,01 % der eingesetzten RNA bei der Reinigungsprozedur bis zu dieser Stufe mitgeschleppt werden. Ausgehend von 300 µg/ml Qß-RNA bedeutet dies, daß die im System verbleibende RNA-Menge (≙ 0,03 µg) in der Größenordnung

der im Enzymtest eingesetzten liegt. Bei Fehlen von Qß-RNA im Testansatz wurde dagegen nur eine Restaktivität von ca. 15 % gefunden. Vermutlich ist ein Teil der RNA degradiert und wird von der Replicase nicht mehr als Matrize akzeptiert. Mit GTP als einzigem Substrat konnte ohne Matrize keine Aktivität nachgewiesen werden (Tab. 4, Exp. 12 und 13).

Exp.Nr.	Test-Bedingung	pMol GMP eingebaut	
12	Matrize Qß-RNA	36,4	*
	ohne Matrize	5,1	
13	Matrize Poly-rC	44,8	
	ohne Matrize	<1,0	
14	Matrize Qß-RNA	36,4	*
	Matrize R17-RNA	<1,0	
15	Matrize Qß-RNA	32,1	+
	Matrize TMV-RNA	2,1	
16	Matrize Qß-RNA komplett	32,1	+
	ohne ATP	1,1	
17	Matrize Qß-RNA komplett	42,7	
	ohne UTP	<1,0	

* +derselbe Kontrollansatz wurde für zwei Experimente verwendet

Tab. 4: Matrizenspezifität von In-vitro-Replicase (aus Happe und Jockusch, 1973a)

Die Matrizenspezifität der in vitro gebildeten Replicase wurde mit R 17- und TMV-RNA untersucht. Während das Enzym an R 17-RNA als Matrize vollständig inaktiv ist, betrug der GMP-Einbau an TMV-RNA ca. 6 % der Kontrolle mit Qß-RNA

(Exp. 14 und 15). Auch das authentische Enzym bevorzugt unter heterologen RNA-Arten TMV- und TYMV-RNA (Haruna und Spiegelman, 1965). Fehlte im Qß-RNA-abhängigen Test ein Triphosphat, so wurde keine RNA synthetisiert (Exp. 16 und 17).

3.5. Enzymkinetische Untersuchungen

In Abb. 5 ist die Zeitabhängigkeit des GMP-Einbaus dargestellt.

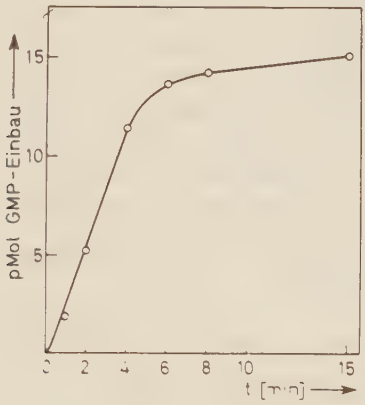

Abb. 5: Zeitabhängigkeit der GTP-Polymerisation. Aus einem 800 µl Testansatz (Poly-rC als Matrize) wurden zum Zeitpunkt t = 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 15 Minuten je 100 µl entnommen, in kalte TCA pipettiert und auf ^{3}H-GMP-Einbau gestestet.

Die Kinetik ist schon nach wenigen Minuten nicht mehr linear, da das Enzym an Poly-rC nicht reinitiieren kann.

In früheren Experimenten (Happe, 1973, Happe und Jockusch, 1973a) wurde eine lineare Kinetik bis zum Zeitpunkt t = 15 Minuten erhalten. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, daß der pH-Wert des Testpuffers anfangs vor Zugabe des Glycerins eingestellt wurde und dadurch unterhalb des pH-Optimums lag.

Die Affinität eines Enzyms zu einem niedermolekularen Substrat (ausgedrückt als K_m-Wert des Substrats) ist ein empfindliches Maß für die intakte Faltung des Enzyms im aktiven Zentrum. Der K_m-Wert der in-vitro-Replicase für GTP wurde im Qß-RNA-abhängigen Test ermittelt. GTP wurde in einem Konzentrationsbereich von 2 - 20 x 10^{-5} M angeboten, die übrigen Triphosphate im Überschuß (2 mM). Unter diesen Bedingungen gelten die gleichen Beziehungen wie für eine Monosubstratreaktion und der Versuch kann nach dem Lineweaver-Burk-Verfahren ausgewertet werden (Abb. 6).

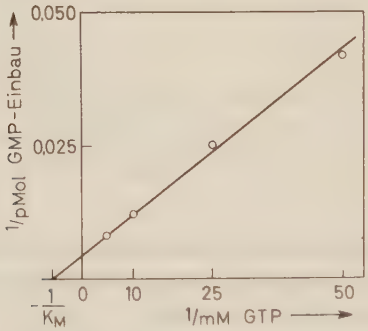

Abb. 6: K_m-Bestimmung für GTP mit in-vitro-Replicase. Partiell gereinigte in-vitro-Replicase aus 0,5 ml in-vitro-Ansatz wurde je Meßpunkt eingesetzt. Die GTP-Konzentration wurde variiert, die Konzentration der übrigen Triphosphate war 2 x 10^{-3}M. Die Testansätze wurden 20 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Der K_m-Wert der in-vitro-Replicase beträgt $1,8 \times 10^{-4}$ Mol/L und stimmt innerhalb der Meßgenauigkeit mit dem für authentische Replicase angegebenen Wert von 2×10^{-4} Mol/L (Eoyang und August, 1968) überein.

3.6. Nachweis der α- und δ-Kette als Bestandteil in vitro gebildeter Replicase

Die wahrscheinlich als Reinigungsartefakt isolierte (Kamen et al., 1972) α-lose Replicase ist mit Qß-RNA als Matrize nur ~1/8 so aktiv wie komplette Replicase. Außerdem unterscheidet sie sich vom kompletten Enzym durch ihre Empfindlichkeit gegenüber hoher Ionenstärke. Durch 0,1 M CsCl im Testansatz wird α-lose Replicase mit Qß-RNA als Matrize völlig gehemmt, während komplette Replicase nicht beeinflußt wird (Kamen et al., 1972).
An Hand dieses Befundes wurde überprüft, ob die in-vitro gebildete Replicase komplett ist. Bis zur Ammoniumsulfatfällung gereinigtes Enzym wurde im Qß-RNA-Standardtest unter Zusatz von 0,1 M CsCl inkubiert. Gegenüber der Kontrolle (ohne CsCl) nahm der GMP-Einbau um 5% ab (Tab. 5, Exp 18). Bei einer geschätzten Fehlerbreite des Tests von 10 % ist dieser Unterschied nicht mehr signifikant.

Für Experiment 19 wurde das Enzym nicht gereinigt, sondern direkt nach Syntheseende eine Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation in Gegenwart von 1,2 M $(NH_4)_2SO_4$ (s. 3.8.) vorgenommen. Die Gradientenfraktionen des 7S-Gipfels wurden vereinigt und das Protein wurde nach Zugabe von 100 µg E. coli Q 13

S 100 als Träger mit $(NH_4)_2SO_4$ (60 % Sättigung) ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 100 µl Puffer A aufgenommen und zwei Stunden gegen diesen Puffer dialysiert. Der Enzymtest ergab, daß die Zugabe von CsCl zum Ansatz eine Senkung des GMP-Einbaus auf 80 % der Kontrolle bewirkte. Diese Reduktion zeigt an, daß 66 % der R-Kette in α-loser Replicase vorliegen.

Exp.Nr.	Testbedingungen	pMol GMP eingebaut	spezifische Aktivität
18	Matrize QB-RNA		
	o CsCl	37,2	-
	+ CsCl	35,5	-
19a	Matrize QB-RNA		
	o CsCl	43,0	2,2 U/µg
	+ CsCl	43,1	
19b	Matrize Poly-rC	78,3	2,2 U/µg

Tab. 5: Nachweis der α-Untereinheit in der in-vitro-Replicase durch Zugabe von 0,1 M CsCl zum Standard-Replicasetest.

Der Gehalt an α-loser Replicase wurde folgendermaßen berechnet:

$$A_{oCsCl} = A_s \left(R_k + \frac{1}{8} R_{-\alpha}\right) \qquad (3)$$

$$A_{+CsCl} = A_s \cdot R_k \qquad (4)$$

$$R_{-\alpha} = \frac{8}{A_s} \left(A_{oCsCl} - A_{+CsCl}\right) \qquad (5)$$

$$R_{-\alpha} = \frac{8}{0,66} (43,0 - 34,1) \qquad \text{(s. Tab. 5)}$$

$$R_{-\alpha} = 0,108 \text{ pMol}$$

A_{oCsCl} [U] = Aktivität ohne CsCl

A_{+CsCl} [U] = Aktivität in Gegenwart von 0,1M CsCl

A_s [U/pMol] = Spezifische Aktivität

R_k [pMol] = Menge an kompletter Replicase

$R_{-\alpha}$ [pMol] = Menge an α-loser Replicase

Aus SDS-Gelen der entsprechenden Fraktionen eines ^{3}H-Histidin-markierten Parallelgradienten wurde ermittelt, daß der 7S-Gipfel 0,217 pMol R-Protein enthielt. Aus diesem Wert und den Gleichungen 4 und 5 ergibt sich, daß 74% des R-Proteins des 7S-Gipfels als aktive Replicase vorliegen.

Bei der Berechnung der spezifischen Aktivität im Poly-rC-abhängigen Test wurde der Anteil α-loser Replicase durch eine Molekulargewichtskorrektur berücksichtigt. (Faktor 1,5). Der im Enzymtest gemessenen Aktivität entsprechen dann 0,154 pMol R-Protein in aktiver Replicase. Dies sind ebenfalls 74 % des R-Proteins im 7S-Gipfel. Im Qß-RNA-abhängigen Test wurden 2,2 pMol GMP je µg Replicase in 10 Minuten bei 30°C eingebaut. Dies entspricht einer spezifischen Aktivität von 4,4 U/µg.

Die Anwesenheit des Elongationsfaktors Ts in der in-vitro-Replicase konnte unter Verwendung eines E. coli-Stammes, mit einer Mutation in diesem Faktor (Kuwano et al., 1973) nachgewiesen werden. Aus den Zellen des Stammes HAK 88, dessen Ts-Faktor temperatursensitiv ist, und aus dem Elternstamm HAK 8 wurde 30.000 g-Überstand hergestellt. Zellextraktisolierung und Durchführung der Proteinsynthese wurden gegenüber E. coli Q 13 leicht modifiziert.

Um eine möglichst schonende Aufarbeitung zu erreichen, wurde zwar DNase beim Zellaufschluß zugegeben, jedoch unterblieb die DNase-Behandlung bei 35 °C. Außerdem wurde die Dialyse des 30.000 g-Überstandes gegen KCl-haltigen Puffer durch Zugabe der entsprechenden Menge an festem KCl ersetzt. Kontrollexperimente mit Q 13-S30 ergaben, daß die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Aminosäuren bei Verwendung von undialysiertem Zellextrakt nicht meßbar herabgesetzt wurde. Die Proteinsynthese wurde ohne Vorinkubation des Zellextrakts bei 30 °C durchgeführt.

Der 30.000g-Überstand aus HAK 8 und HAK 88 wies mit Qß-RNA als mRNA nur eine geringe proteinsynthetisierende Aktivität auf. Dagegen wurde an Poly-rC eine mit den Literaturwerten vergleichbare Menge Polyprolin synthetisiert (Kuwano et al., 1973). Durch Zugabe von 250 µg/ml Q 13-Ribosomen (100,000g Sediment, gelöst in S30-Puffer) ließ sich der Histidin-Einbau auf mit Q 13 vergleichbare Werte steigern. Vermutlich ist in den beiden Stämmen ein weiteres Protein, das für die Erkennung natürlicher mRNA erforderlich ist, mutiert, da mit Poly-rU als mRNA noch Polyphenylalanin synthetisiert werden konnte (Kuwano et al., 1973).

Die in den beiden Systemen gebildeten in-vitro-Replicasen wurden partiell gereinigt und in einem thermischen Denaturierungsversuch verglichen. Unter der Annahme, daß die Denaturierung der Replicase unter den Versuchsbedingungen irreversibel ist, wurden die Enzyme bei 30 °C und 42 °C 0,75 bis 2,75 Minuten vorinkubiert. Die Vorinkubation

weist gegenüber der Durchführung des Tests bei verschiedenen Temperaturen den Vorteil auf, daß die Inaktivierung des Enzyms im Enzymtest konstant gehalten wird. Die verbleibende Aktivität wurde im Poly-rC-abhängigen Test bei 30 °C gemessen.

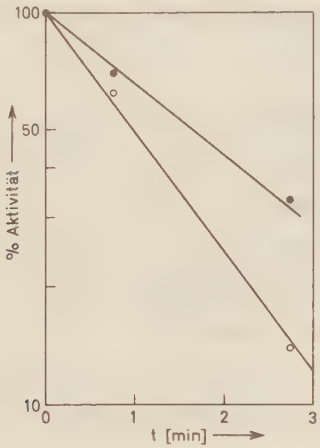

Abb. 7: Nachweis des Einbaus des Wirtsproteins Ts in die in-vitro-Replicase.
Die zellfreie Proteinsynthese wurde mit Extrakten der Stämme E. coli HAK 88 (temperatursensitive Mutation in Ts) und HAK 8 (Elternstamm) durchgeführt. Die partiell gereinigten Replicasen wurden vor dem Enzymtest thermisch denaturiert.

●—● HAK 8-System, 100 % ≙ 36 pMol GMP-Einbau
o—o HAK 88-System, 100 % ≙ 18 pMol GMP-Einbau

Exp.Nr.	Stamm	T[°C]	t[min]	pMol GMP eingebaut	% Aktivität
		-	-	23	100 (Def.)
20a	HAK 8	30	2	19	83
		42	2	13	57
		-	-	12	100 (Def.)
20b	HAK 88	30	2	7	58
		42	2	4	33

Tab. 6: Nachweis der δ-Kette in der in-vitro-Replicase durch thermische Denaturierung.

In beiden Experimenten (Tab. 6 und Abb. 7) ergab sich, daß die mit HAK 88-Zellextrakt gebildete Replicase wesentlich leichter denaturierte als das Kontrollenzym. Im Zeitversuch wurde ein exponentieller Abfall der Aktivität gefunden, was einer irreversiblen Denaturierung mit einer Kinetik 1. Ordnung entspricht.

3.7. Charakterisierung des Produkts der enzymatischen Reaktion

Zunächst wurde überprüft, ob das Produkt der enzymatischen Raktion RNase-sensitiv ist. Da pankreatische Ribonuklease, die für diesen Test verwendet wurde, bei höherer Ionenstärke keine Doppelstrang-RNA abbaut, wurde der Testansatz für die Experimente 22 und 24 (Tab. 7) zwei Stunden gegen 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,0, dialysiert. Die Probe wurde 30 Minuten bei 35 °C mit 125 µg/ml pankreatischer Ribonuklease verdaut. Tabelle 7 zeigt, daß ohne vorangehende Dialyse nur ein sehr geringer Anteil des radioaktiven Materials RNase-sensitiv ist. Als Ursache hierfür ist die Ausbildung von Doppelsträngen anzunehmen.

Exp.Nr.	Matrize	Dialyse	eingesetzte Radioakt. [cpm]	RNase-resistent [cpm]	Abbau [%]
21	Qß-RNA	o	2.767	1.950	29,7
22	Qß-RNA	+	1.675	214	83,2
23	Poly-rC	o	425	382	11,3
24	Poly-rC	+	1.193	104	91,3

Tab. 7: Nukleolytischer Abbau des Produkts der Replicase-reaktion.

Das Produkt der enzymatischen Reaktion wurde weiterhin auf seine Größenverteilung durch Gelelektrophorese untersucht. Das RNA-Muster, das nach Acrylamid-Gelelektrophorese erhalten wurde, ist in Abb. 8 dargestellt. Als Molekulargewichtsmarker wurden Qß- und tRNA verwendet.

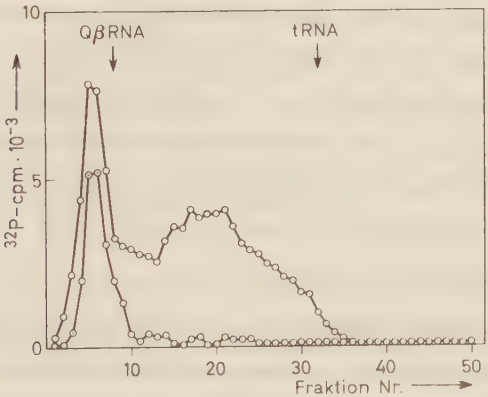

Abb. 8: Größenverteilung der Produkte von in-vitro-Replicase und authentischer Replicase.
Mit in-vitro-Replicase und authentischer Replicase synthetisierte ^{32}P-markierte RNA wurde in 2,6 %igen

Polyacrylamidgelen (6 x 100 mm) 3 Stunden bei 50V und 5 mA/Röhrchen elektrophoretisch aufgetrennt. (Anode rechts). 2 mm-Gelscheiben wurden in 1 ml H_2O mit einer Zählausbeute von 38 % im ^3H-Kanal gezählt (Cerenkov-Zählung).
In-vitro-Replicase: (e—e), in-vivo-Replicase (o—o).

Die geringere Mobilität der ^{32}P-markierten RNA ist darauf zurückzuführen, daß bei der Phenolisierung des Enzymtestansatzes ein großer Überschuß an Qß-RNA als Träger eingesetzt und damit die Bildung von Doppelstrang-RNA begünstigt wurde.

Mit der α-^{32}P-markierten RNA wurde nachgewiesen, daß der im Enzymtest gemessene GMP-Einbau nicht auf unspezifischer Bindung von markiertem GTP an Enzym oder Matrize beruht oder auf der Bildung eines Homopolymeren, sondern daß eine Kopie der angebotenen Qß-RNA unter Veresterung der α-Phosphatgruppe angefertigt wird. Nach nukleolytischem Abbau der im Enzymtest synthetisierten RNA mit T1/T2-RNase sollte dann das dem GMP jeweils benachbarte Nukleotid die markierte Phosphatgruppe tragen (Josse et al., 1961). Die im GTP eingesetzte Markierung müßte also in allen vier Nukleotiden wiedergefunden werden.

Aus Abb. 9 ist ersichtlich, daß mit in-vitro-Replicase und authentischer Replicase RNA synthetisiert wurde, bei der alle vier Nukleotide ^{32}P-markiert sind.

Von der Startlinie ausgehend wurden die Flecken folgendermaßen zugeordnet (Mundry und Priess, 1972):
1 = CMP, 2 = AMP, 3 = GMP und 4 = UMP.

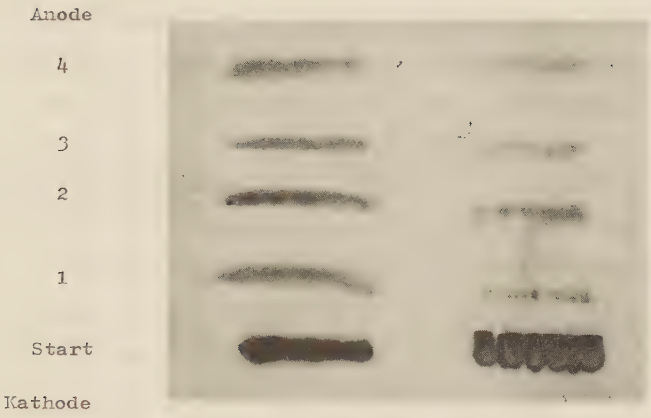

Abb. 9: Nearest-Neighbour-Analyse von Qß-RNA mit in-vitro-Replicase und authentischer Replicase.
Die mit den Replicasen synthetisierte α-^{32}P-markierte RNA wurde mit T1/T2-RNase verdaut. 10 µl des Nukleotidgemisches wurden auf einer Celluloseplatte unter Varsolkühlung aufgetrennt. Die Laufzeit betrug 30 Minuten bei 1.500 V und 80 - 250 mA in 20 %iger Essigsäure, pH 3,5. Das mit in-vitro-Replicase erhaltene Material (links) enthielt 25.000 dpm, das mit authentischer Replicase erhaltene (rechts) 18.000 dpm.

Tabelle 8 zeigt die quantitative Auswertung des Experiments. Aus der Literatur sind keine Angaben über eine Nearest-Neighbour-Analyse von Qß-RNA bekannt. Unter der Annahme, daß die Basen in der Qß-RNA statistisch verteilt sind, sollte jedoch die Nearest-Neighbour-Analyse die gleiche prozentuale Verteilung liefern wie die Analyse der RNA nach Markierung mit allen Triphosphaten.

Der Fleck am Start, der im UV-Licht nicht sichtbar war, dürfte auf Adsorption von radioaktivem Material an T1/T2-RNase zurückzuführen sein.

Base	von α-^{32}P-GTP übertragenes ^{32}P in-vitro-Replicase	^{32}P in-vivo-Replicase	Basenzusammensetzung von Qβ-RNA Minusstrang *
C	25 %	23 %	24,2 %
A	30 %	3Ø %	29,1 %
G	23 %	24 %	23,9 %
U	22 %	23 %	22,8 %

* (Weissmann et al., 1968)

Die Absorption der Flecken der Röntgenplatte wurde im Joyce Loebl Microdensitometer MK III B ermittelt, da die Ergebnisse aus der Radioaktivitätsbestimmung der Dünnschichtplatte vermutlich aufgrund von Adsorptionseffekten nicht mit dem Schwärzungsgrad des Films übereinstimmten. Die Absorption wurde an vier verschiedenen Stellen jedes Flecks gemessen. Aus dem Mittelwert der Fläche unter dem Gipfel wurde dann die prozentuale Häufigkeit der Nachbarschaft jedes Nukleotids zu GMP berechnet, unter der Annahme, daß die Schwärzung der Röntgenplatte dem ^{32}P-Gehalt proportional ist. Übereinstimmend mit der deutlich stärkeren Schwärzung des dem Nukleotid AMP zugeordneten Flecks wurde auch bei der quantitativen Auswertung AMP als häufigster Nachbar von GMP ermittelt.

3.8. Assoziation der Replicaseuntereinheiten

Da der Replicasetest erst nach partieller Reinigung möglich ist, kann mit Aktivitätstests die Frage nicht beantwortet werden, ob der Replicasekomplex spontan im proteinsynthetisierenden System oder erst im Zuge der Reinigung entsteht. Zur Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten wurde das Sedimentationsverhalten von Histidin-markierter R-Kette unter Bedingungen untersucht, unter denen die RNA-Bindung aufgehoben ist.

200 µl-Proben wurden direkt nach Syntheseende durch Dichtegradienten, die 1,2 M an $(NH_4)_2SO_4$ waren, zentrifugiert. Die Ionenstärke entsprach dann derjenigen von 2M NaCl, die im PEG-Dextran-Phasensystem zur Trennung von RNA und Protein angewandt wurde. Unter diesen Bedingungen sollte die Replicase im 7S-Bereich des Gradienten erscheinen.

Aus Abb. 10 ist zu ersehen, daß nur ein geringer Bruchteil des R-Proteins im 7S-Komplex vorlag. Die Untereinheiten assoziieren demnach nicht spontan sondern erst während des Reinigungsprozesses, möglicherweise durch den Einfluß der hohen Ionenstärke oder Proteinkonzentrierung im Verlaufe der Ammoniumsulfatfällung. Es wurde geprüft, ob eine Ammoniumsulfatfällung direkt nach Syntheseende mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation den gleichen Effekt hat wie die Reinigung. Gradienten von Histidin-markierten Produkten mit und ohne vorangehende $(NH_4)_2SO_4$-Fällung sind in Abb. 10 dargestellt, SDS-Gele der 4S- und 7S-Regionen der Gradienten in Abb. 11. Der 7S-Bereich

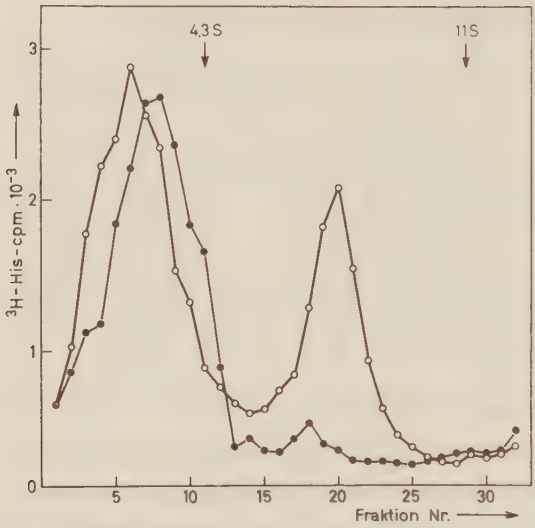

Abbildung 10

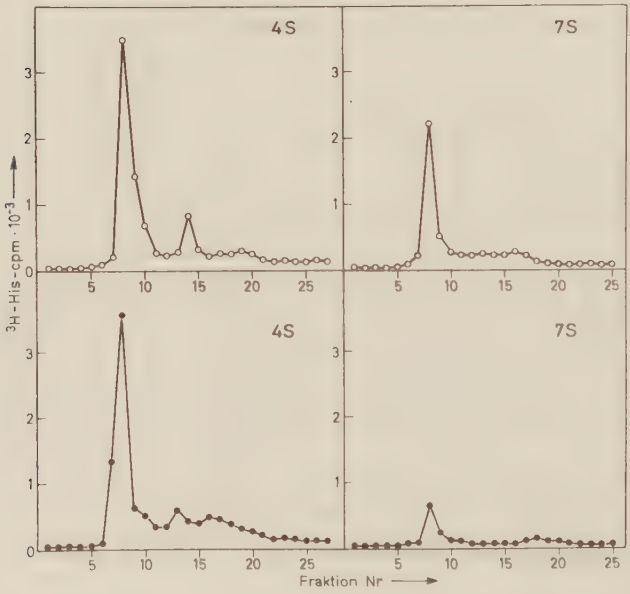

Abbildung 11

Abb. 10: Assoziation des in-vitro-Replicase-Komplexes nach Ammoniumsulfatpräzipitation.
Mit ^{3}H-Histidin (spez. Akt. 5 Ci/mMol) markierte in-vitro-Produkte wurden 20 Stunden durch 10 - 30 %ige Glyceringradienten zentrifugiert, die 1,2 M an $(NH_4)_2SO_4$ waren.

o——o Zentrifugation nach $(NH_4)_2SO_4$-Fällung
•——• ohne $(NH_4)_2SO_4$-Fällung

Abb. 11: Polypeptidkettengehalt der 4S- und 7S-Regionen der in Abb. 10 dargestellten Gradienten.
Die Fraktionen 4 - 8 und 18 - 21 des Gradienten mit vorangehender $(NH_4)_2SO_4$-Fällung und die Fraktionen 6 - 10 und 17 - 20 des Kontrollgradienten wurden in SDS-Gelen analysiert. Die Symbole sind identisch mit denen für Abb. 10.

Fraktion 8 ≙ R-Protein, Fraktion 13 ≙ Durchlese-protein, Fraktion 37 ≙ Bromphenolblau.

enthält nach $(NH_4)_2SO_4$-Fällung 1,5 %, ohne $(NH_4)_2SO_4$-Fällung dagegen nur 0,3 % des synthetisierten R-Proteins. Da die Proben vor der Zentrifugation 5 Stunden gegen den Gradientenpuffer dialysiert wurden, ist das Auftreten des Replicasekomplexes im Gradienten ohne vorangehende Ammoniumsulfatfällung vermutlich auf die hohe Ionenstärke, die Vergrößerung des Gipfels nach Ammoniumsulfatfällung dagegen auf die Proteinkonzentrierung zurückzuführen. Für diese Deutung spricht, daß bei Verkürzung der Dialysezeit die Höhe des 7S-Gipfels abnahm.

In Experimenten, in denen wenig R-Protein synthetisiert

worden war, konnte trotz $(NH_4)_2SO_4$-Fällung kein 7S-Gipfel nachgewiesen werden. Durch Zugabe von Träger-Enzym (authentische Replicase, partiell gereinigt) wurde überprüft, ob die Stabilität der in-vitro-Replicase konzentrationsabhängig ist. Aus Abb. 12 ist zu ersehen, daß die Anwesenheit von Trägerenzym nur zu einer mäßigen Vergrößerung des 7S-Gipfels führte. Aus SDS-Gelen der 7S-Region wurde ermittelt, daß der Gehalt des Gipfels an R-Protein um 50% zunahm.

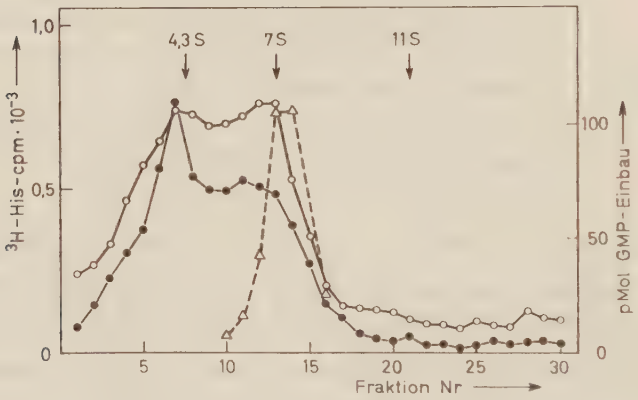

Abb. 12: Effekt von Träger-Enzym auf das Sedimentationsverhalten der in-vitro-Replicase.
Zu Histidin-markierten in-vitro-Produkten wurde vor der $(NH_4)_2SO_4$-Fällung partiell gereinigte authentische Replicase zugegeben. Die Kontrolle erhielt kein Trägerenzym. Die Zentrifugationszeit betrug 16 Stunden (Gradienten wie in Abb. 1o).
o —o Zugabe von authentischer Replicase
• —• ohne authentische Replicase
∆ — ∆ Aktivität authentischer Replicase

Um auszuschließen, daß es sich bei den in-vitro-Produkten, die mit authentischer Replicase cosedimentieren, um isolierte R-Kette gebunden an ein RNA-Fragment handelt - schon ca. 300 Nukleotide würden zur Bildung eines solchen Komplexes ausreichen - wurde eine Kontrolle während der Proteinsynthese mit ^{3}H-Qß-RNA (2,5 x 10^{5} dpm) und unmarkierten Aminosäuren inkubiert (s. 3.4.). Es zeigte sich, daß 0,3 pMol R-Protein und nur ≤ 0,002 pMol Qß-RNA in der 7S-Region des Gradienten enthalten waren. Damit scheidet eine RNA-Bindung als Erklärung für den 7S-Gipfel aus.

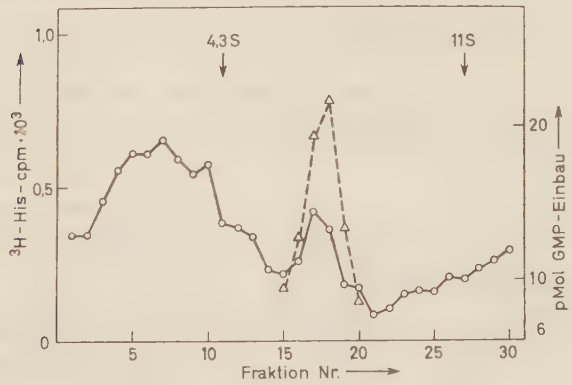

Abb. 13: Sedimentationsverhalten und Aktivität des in-vitro-Replicase-Komplexes nach Ammoniumsulfatfällung.
Die Zentrifugationszeit betrug 19 Stunden (Gradienten wie in Abb. 10). 20 µl jeder Fraktion wurden zur Bestimmung der TCA-fällbaren Radioaktivität (o—o) entnommen. Die Fraktionen wurden einzeln 2 Stunden gegen Puffer A dialysiert und mit ^{32}P-GTP auf Replicaseaktivität getestet (Δ—Δ).

Durch Einsetzen von ^{32}P-GTP war es möglich, die Fraktionen eines ^{3}H-markierten 7S-Gipfels ohne Konzentrierung einzeln auf Replicaseaktivität zu testen. Je Fraktion (gegen Puffer A dialysiert) wurden 2,5 µCi im Poly-rC-abhängigen Test eingesetzt.

Abb. 13 zeigt eine gute Korrelation zwischen Protein- und Aktivitätsgipfel. Die Fraktionen der 4S-Region und die entsprechenden Fraktionen eines Gradienten ohne vorangehende Ammoniumsulfatfällung waren inaktiv.

In Tabelle 10 ist für verschiedene Versuchsbedingungen der aus SDS-Gelen ermittelte Gehalt des 4S- und 7S-Gipfels an R-Potein zusammenfassend dargestellt.

Reinigungs-bedingungen	pMol R-Protein synthetisiert	4S [pMol]	4S [%]	7S [pMol]	7S [%]
16h Gradient					
• $(NH_4)_2SO_4$	15,8	0,135	0.09	0,346	2,2
o $(NH_4)_2SO_4$		0,181	1,15	0,229	1,45
20h Gradient					
+ $(NH_4)_2SO_4$	16,4	0,283	1,73	0,221	1,45
o $(NH_4)_2SO_4$		0,300	1,83	0,052	0,32
+ auth. Enz.	16,3	0,09	0,55	0,23	1,4
o auth. Enz.		0,075	0,46	0,15	0,92
partielle Reinigung	12,3	0	0	0,08	0,65

Tab. 10: Sedimentationsverhalten Histidin-markierter R-Kette in Abhängigkeit von den Bedingungen während der Reinigung.

4. Diskussion

4.1. Enzymatische Eigenschaften der in-vitro-Replicase

Es wurde gezeigt, daß in-vitro-Replicaseaktivität nach Qß-RNA-abhängiger Proteinsynthese auftritt, und daß sich das partiell gereinigte Enzym wie authentische Replicase verhält.

Damit war der erste Schritt der Replikation des Coliphagen Qß, nämlich die Bildung des Replikationskomplexes aus dem Translationsprodukt des R-Gens und drei Wirtsproteinen unter zellfreien Bedingungen nachvollzogen worden.

Das in-vitro-Enzym wurde durch folgende Größen charakterisiert: Zeitabhängigkeit und Produkt der enzymatischen Reaktion, K_m-Wert, Matrizenspezifität, Ionenstärkeabhängigkeit und Sedimentationskoeffizient.

Je nach Vorbehandlung des Enzyms wurde ein unterschiedliches Verhalten gegenüber hoher Ionenstärke festgestellt. Wurde direkt nach Syntheseende eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, so bildeten sich nur ca 34% komplette Replicase, das restliche Enzym war α-los. Demgegenüber war nach partieller Reinigung kein meßbarer Anteil α-loser Replicase nachweisbar (s. 3.6.). Die Berechnung des Anteils α-loser Replicase nach Gleichung (5) erlaubt allerdings wegen der Fehlerbreite des Enzymtests nur die Aussage, daß zwischen Ø und 23 % des partiell gereinigten in-vitro-Enzyms α-los sind. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Vorbehandlungen des Enzyms ist, daß bei der partiellen

Enzymreinigung auf der Stufe der Dextranentfernung 90 % des vor der Ammoniumsulfatzugabe vorhandenen R-Proteins in der Dextranphase verloren gehen. Vermutlich ist das Absinken des Anteils α-loser Replicase nach partieller Reinigung auf Verluste in diesem Reinigungsschritt zurückzuführen.

4.2. Assoziation von Wirtsproteinen und R-Kette

Während der Proteinsynthese bilden die Elongationsfaktoren Tu und Ts und der Translationskontrollfaktor i einen Komplex mit der wachsenden R-Kette. Daher könnte man annehmen, daß die Assoziation der vier Replicaseuntereinheiten spontan nach Fertigstellung des R-Proteins erfolgt. Bei einem direkten Übergang des Synthesekomplexes in den Enzymkomplex würde das kinetische Problem einer diffusionskontrollierten Assoziation von drei Komponenten (Tu und Ts liegen bereits in der Zelle assoziiert vor) gar nicht erst auftreten.

Die Frage der Untereinheitenassoziation wurde durch Analyse des Sedimentationsverhaltens ^{3}H-Histidin-markierter R-Kette untersucht, da der Nachweis der Replicaseaktivität die Entfernung des Qß-RNA-Überschusses durch eine partielle Reinigung erfordert. In-vitro-Proben wurden nach Syntheseende unter Bedingungen (1,2 M $(NH_4)_2SO_4$) zentrifugiert, unter denen keine Enzym-RNA-Bindung mehr stattfindet. In Glyceringradienten, die 1,2 M an $(NH_4)_2SO_4$ waren, zeigte sich kein 7S-Gipfel. Ferner trat gegenüber Gradienten, die 0,2 M an $(NH_4)_2SO_4$ waren, keine Vergrößerung des 4S-Gipfels auf.

Andererseits war aber in Bindungsversuchen festgestellt worden, daß die R-Kette bei 0,15 M $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration noch nicht von der Qß-RNA abgelöst wird (Jockusch und Hindennach, 1972). Es ist unwahrscheinlich, daß die kritische Ionenstärke für die Ablösung gerade zwischen 0,15 und 0,2 M $(NH_4)_2SO_4$ liegt. Eher ist anzunehmen, daß die R-Kette bei $(NH_4)_2SO_4$-Konzentrationen > 0,2 M zwar von der RNA abgelöst wird, dann aber denaturiert, da sie in Gegenwart hoher Ionenkonzentration weniger stabil ist als Replicase. Beide Möglichkeiten würden zu der gleichen Bilanz führen.

Eine spontane Assoziation der Replicase aus dem Proteinsynthesekomplex wurde unter zellfreien Bedingungen nicht gefunden.

Für die in-vitro-Bildung von Enzymen, die aus mehreren Polypeptidketten aufgebaut sind, gibt es bisher zwei Beispiele: ß-Galactosidase (Zubay und Chambers, 1969) und alaklische Phosphatase (Dohan et al., 1971) In beiden Fällen konnte wie bei der in-vitro-Replicase die Assoziation der Untereinheiten nur bei hoher Ionenstärke erreicht werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen intakten E. coli-Zellen und dem zellfreien System ist die Ribosomenkonzentration. Sie mußte in vitro um den Faktor 15 geringer gehalten werden als in vivo, um eine ausreichende Synthese von intakten R-Ketten zu erzielen (s. 2.7.). Es ist anzunehmen, daß durch die Zugabe von Ammoniumsulfat Bedingungen geschaffen werden, die die in vivo vorliegenden ersetzen, indem entweder eine notwendige Konzentrierung der beteiligten

Proteine erreicht wird und/oder durch die hohe Ionenstärke ein bestimmtes lokales Milieu in der Zelle simuliert wird.

4.3. Ausbeute an funktionellem R-Protein unter verschiedenen Synthese- und Reinigungsbedingungen

Je nach Reinigungsbedingungen bilden 0,5 - 2,2 % des im zellfreien System synthetisierten R-Proteins Replicase (Tab. 10). Die wirtsspezifischen Untereinheiten liegen im System im 10fachen Überschuß (molares Verhältnis Ribosomen : Proteinsynthesefaktoren = 1 : 1 (Gordon, 1970)) gegenüber der Gesamtmenge an synthetisierter R-Kette vor. Der limitierende Faktor bei der Enzymbildung ist demnach wahrscheinlich die geringe Menge an nativem R-Protein. In vitro wird zwar mehr R-Protein pro Ribosom synthetisiert als in infizierten Zellen (Happe, 1973), die Ausbeute bei der Assoziation der Untereinheiten ist jedoch sehr gering. Hierfür bestehen folgende Erklärungsmöglichkeiten:

1. Da die Replicasebildung nicht spontan erfolgt, fehlt der stabilisierende Einfluß der Wirtsfaktoren auf die R-Kette. Das Protein denaturiert bei der Synthesetemperatur und dem vorliegenden Ionenmilieu laufend. Dann sollten bevorzugt die zuletzt synthetisierten R-Untereinheiten aktives Enzym bilden. Hierfür spricht die Beobachtung, daß die Menge R-Protein, die Replicase bildet, geringeren Schwankungen von Experiment zu Experiment unterworfen ist als die Gesamtsynthese dieses Proteins.

2. Nur ein kleiner Teil der R-Kette wird während oder nach der Synthese richtig gefaltet. Dafür könnte die in vitro unvollständig verlaufende Entfernung des N-terminalen Formyl- uder Formylmethionylrestes verantwortlich sein. Da die abspaltenden Enzyme durch ß-Mercaptoäthanol gehemmt werden, wurde diese Möglichkeit in einem Einbauversuch mit ß-Mercaptoäthanol-freiem Zellextrakt untersucht. Es wurde zwar eine unerwartete Steigerung der Synthese von R-Protein um den Faktor 4 erreicht, die spezifische Aktivität des Enzyms betrug jedoch nur noch 30 % der Kontrolle. Das Absinken der spezifischen Aktivität ist vermutlich auf Oxydation funktionell wichtiger SH-Gruppen zurückzuführen, da das Protein sehr cysteinreich ist (Jockusch und Hindennach, 1972). Ein positiver Effekt der im S 30 vorhandenen Deformylase- und Aminopeptidaseaktivität konnte folglich nicht festgestellt werden. Eine dem Ansatz zugesetzte Aminopeptidase mit Deformylaseaktivität aus B. stearothermophilus konnte die Ausbeute an funktionsfähigem R-Protein auch nicht erhöhen.
3. Die Replicase ist in geringer Konzentration sehr instabil. In Abb. 12 wurde gezeigt, daß Zugabe von authentischer Replicase vor der Ammoniumsulfatfällung die Ausbeute an R-Protein im 7S-Komplex erhöhte. Hierbei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die im Trägerenzym angebotenen Wirtsuntereinheiten mit weiteren markierten ß-Ketten assoziieren.

Eine Überprüfung der hier aufgeführten Möglichkeiten wäre mit nativer R-Kette möglich, die jedoch aus authentischem Enzym bisher nicht isoliert werden konnte.

5. Zusammenfassung

Qß-Replicase ist ein Enzymkomplex (Sedimentationskoeffizient 7S) aus drei E. coli-spezifischen (α, γ, δ) und einer phagencodierten (ß=R) Untereinheit.

Nach zellfreier Translation des R-Gens von Qß-RNA mit Extrakten aus uninfizierten E. coli-Zellen bildet ein kleiner Bruchteil (0,5 - 2,2 %) des synthetisierten R-Proteins aktive Replicase. Experimente mit partiell gereinigter in-vitro-Replicase ergaben:

1. Das Auftreten von Replicaseaktivität ist abhängig von vorangehender Qß-RNA-stimulierter Proteinsynthese.
2. Durch Untersuchungen der Zeit-, Substrat- und Matrizenabhängigkeit der enzymatischen Reaktion sowie des Sedimentationsverhaltens wurde nachgewiesen, daß die Eigenschaften des in-vitro-Enzyms identisch sind mit denjenigen authentischer Replicase.
3. Als Matrize eingesetzte Qß-RNA wird von in-vitro-Replicase in voller Länge kopiert. Eine Nearest-Neighbour-Analyse der synthetisierten RNA ergab, daß dabei alle vier Ribonukleotide in 5'-Nachbarschaft zum GMP markiert wurden wie bei der Synthese mit authentischem Enzym.
4. Die Aktivität der in-vitro-Replicase wurde im Gegensatz zu α-loser Replicase durch 0,1 M CsCl im Testansatz nicht vollkommen gehemmt. Ein Teil des in-vitro-Enzyms liegt demnach als komplette Replicase vor. Der Einbau des Wirtsproteins Ts in die Replicase konnte durch Verwendung einer E. coli Mutante, deren Ts-Faktor temperatursensitiv ist, nachgewiesen werden.
5. Der Zusammenschluß der Replicaseuntereinheiten erfolgt

nicht spontan während der Synthese, sondern erst unter dem Einfluß der hohen Ionenstärke und der Proteinkonzentrierung während der Reinigung.

Abkürzungen

BPB	Bromphenolblau
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
in-vitro-Replicase	Replicase, deren phagenspezifische Untereinheit in vitro synthetisiert wurde
PEG	Polyäthylenglykol
pfu	plaque forming unit(s)
PNase	Polynukleotidphosphorylase
Poly-rC	Polycytidylsäure
Poly-rG	Polyguanylsäure
Poly-rU	Polyuridylsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
S 30	30.000 g-Überstand
S 100	100.000 g-Überstand
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TMV	Tabakmosaikvirus
TYMV	Turnip Yellow Mosaikvirus

Literaturverzeichnis

Adams, J. M.: On the release of the formyl group from nascent protein. J. Mol. Biol. 33, 571 - 589 (1968).

Ball, L. A., Kaesberg, P.: Cleavage of the N-terminal formylmethionine residue from a bacteriophage coat protein in vitro. J. Mol. Biol. 79, 531 - 537 (1973).

Blumenthal, T., Landers, T. A., Weber, K.: Bacteriophage Qß replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF Tu and EF Ts. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69, 1313 - 1317 (1972).

Boedtker, H.: Conformation independent molecular weight determinations of RNA by gel electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta 240, 448 - 453 (1971).

Capecchi, M. R.: Cell-free protein synthesis programmed with R 17 RNA: Identification of two phage proteins. J. Mol. Biol. 21, 173 - 193 (1966).

Clark, B. F. C., Marcker, K. A., Rudland, P. S., Andersson, J. S., Dube, S. K. in: Macromolecules, Biosynthesis and function, Proc. 6th Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc. (1969), Herausgeber: Ochoa, S., Asensio, C., Heredia, C. F., Nachmansohn, D., Academic Press, London, 1970. S. 73 - 84.

Dohan, F. C., jr., Rubman, R. H., Torriani, A.: In vitro synthesis of Escherichia coli alkaline phosphatase. J. Mol. Biol. 58, 469 - 479 (1971).

Eikhom, T. S., Spiegelman, S.: The dissociation of Qß replicase and the relation of one of the components to a poly-C-dependent poly-C-polymerase. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 57, 1833 - 1840 (1967).

Enger, M. D., Stubbs, E. A., Mitra, S., Kaesberg, P.: Biophysical characteristics of the RNA-containing bacterial virus R17. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 49, 857 - 860 (1963).

Eoyang, L., August, J. T. in : Methods in enzymology Band 12 B, S. 530 - 540 (1968). Herausgeber:

L. Grossman u. K. Moldave.

Fedoroff, N. V., Zinder, N. D.: Structure of the poly(G) polymerase component of the bacteriophage f2 replicase. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 68, 1838 - 1843 (1971).

Franze de Fernandez, M. T., Hayward, W. S., August, J. T.: Bacterial proteins required for replication of phage Qß ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid binding protein. J. Biol. Chem. 247, 824 - 831 (1972).

Fromageot, H. P. M., Zinder, N. D.: Growth of bacteriophage f2 in E. coli treated with rifampicin. Proc. Nat. Acad. Sci, U. S. 61, 184 - 191 (1968).

Garwes, D., Sillero, A., Ochoa, S.: Virus-specific proteins in Escherichia coli infected with phage Qß. Biochim. Biophys. Acta 186, 166 - 172 (1969).

Gierer, A., Schramm, G.: Infektiosität der Nucleinsäure aus Tabakmosaikvirus. Z. Naturforschung 11 b, 138 - 142 (1956).

Gordon, J.: Regulation of the in vivo synthesis of the polypeptide chain elongation factors in Escherichia coli. Biochemistry 9, 912 - 917, (1970).

Groner, Y., Sheps, R., Kamen, R., Kolakofsky, D., Revel, M.: Host subunit of Qß-replicase is translation control factor i. Nature (New Biology) 239, 19 - 21 (1972).

Gupta, P.: Thesis, Department of Biochemistry, University of Wisconsin, Madison,(1972).

Happe, M.: Partielle Reinigung von Qß-Replicase im Halbmikromaßstab: Vergleich des Produkts zellfreier Proteinsynthese mit dem Enzym aus infizierten Zellen. Diplomarbeit, Tübingen (1973).

Happe, M., Jockusch, H.: Cell-free protein synthesis resulting in active phage Qß-replicase. Nature (New Biology) 245, 141 - 143 (1973 a).

Happe, M., Jockusch, H.: Cell-free protein synthesis resulting in active phage Qß replicase (Abstr.) 2nd Duran Reynals International symposium "Viral Replication and Cancer", Barcelona (1973 b).

Hartmann, G., Honikel, K., Knüsel, F., Nüesch, J.: The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifampicin. Biochim. Biophy. Acta 145, 843 - 844 (1965).

Haruna, I., Spiegelman, S.: Specific template requirement of RNA replicase. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 54, 579 - 587 (1965).

Herrlich, P., Schweiger, M.: RNA-polymerase synthesis in vitro directed by T7 phage DNA. Mol. Gen. Genetics 110, 31 - 35 (1971).

Hindennach, I., Jockusch, H.: Peptide mapping of phage Qß proteins using cell-free synthesis. Virology (1974), im Druck.

Hori, K.: Qß-replicase associated polycytidylic acid-dependent polyguanylic acid polymerase. II. Effect of matural and synthetic polyribonucleotides on the reaction. J. Biochem. 74, 273 - 278 (1973).

Horiuchi, K., Webster, R. E., Matsuhashi, S.: Gene products of bacteriophage Qß. Virology 45, 429 - 439 (1971).

Jockusch, H., Ball, A., Kaesberg, P.: Synthesis of polypeptides directed by the RNA of phage Qß. Virology 42, 401 - 414 (1970).

Jockusch, H., Hindennach, I.: Properties of Qß-replicase protein synthesized in a cell-free system. Eur. J. Biochem. 29, 353 - 361 (1972).

Jockusch, H., Hindennach, I., Happe, M.: Struktur und Aktivität in vitro synthetisierter Replikase des RNA-Phagen Qß. (Abstr.). Herbsttagung der

Gesellschaft für Biologische Chemie, Innsbruck (1973).

Josse, J., Kaiser, A. D., Kornberg, A.: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. VIII. Frequencies of nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acid. J. Biol..Chem. 236, 864 - 875 (1961).

Kamen, R.: Characterization of the subunits of Qß replicase. Nature 228, 527 - 533 (1970).

Kamen R.: A new method for the purification of the Qß RNA-dependent RNA polymerase. Biochim. Biophys. Acta 262, 88 - 100 (1972).

Kamen, R., Kondo, M., Römer, W., Weissmann, C.: Reconstitution of Qß replicase lacking subunit α with protein-synthesis-interference factor i. Eur. J. Biochem. 31, 44 - 51 (1972).

Königsberg, W., Maita, T., Katze, J., Weber, K.: Aminoacid sequence of Qß coat protein. Nature 227, 271 - 273 (1970).

Kondo, M., Gallerani, R., Weissmann, C.: Subunit structure of Qß replicase. Nature 228, 525 - 527 (1970).

Kondo, M., Weissmann, C.: Inhibition of Qß replicase by excess template. Eur. J. Biochem. 24, 530 - 537 (1972).

Kuwano, M., Ono, M., Yamamoto, M., Endo, H., Kamiya, T., Hori, K.: Elongation factor T altered in a temperature-sensitive Escherichia coli mutant. Nature (New Biology) 244, 107 - 109 (1973).

Loening, U. E.: The fractionation of high molecular weight ribonucleic acid by polyacrylamid gel electrophoresis. Biochem. J. 102, 251 - 257 (1967).

Maizel, J. V., jr.: Acrylamid gel electrophoresis of nucleic acids and proteins. In: Fundamental techniques in virology. Herausgeber K. Habel u. N. Salzman. Academic Press N. Y. (1969).

Mans, R. J., Novelli, G. D.: Measurement of the incorporation of radioactive aminoacids into protein by a filter paper disc method. Arch. Biochem. 94, 48 - 53, (1961).

Mundry, K. W., Priess, H.: A quantitative technique for mapping oligonucleotides on thin layers of cellulose. Biochim. Biophys. Acta 269, 225 - 236 (1972).

Salser, W., Gesteland, R. F., Bolle, A.: In vitro synthesis of bacteriophage lysozyme. Nature 215, 588 - 591 (1967).

Shapiro, L., Franze de Fernandez, M. T., August, J. T.: Resolution of two factors required in the Qß RNA polymerase reaction. Nature 220, 478 - 480 (1968).

Sinsheimer, R. L., Starman, B., Nagler, C., Guthrie, S.: The process of infection with bacteriophage ϕX174 I. Evidence for a "replicative form". J. Mol. Biol. 4, 142 - 160 (1962).

Szer, W., Ochoa, S.: Complexing ability and coding properties of synthetic polynucleotides. J. Mol. Biol. 8, 823 - 834 (1964).

Traub, P., Zillig, W.: Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine. VI. Eine neue Methode zur Darstellung eines zellfreien Systems aus Escherichia coli und deren Eigenschaften in der nucleinsäureabhängigen Proteinsynthese. Hoppe-Seylers Zeitschrift f. phys. Chemie 343, 246 - 260 (1966).

Watanabe, M., August, J. T. in: Methods in virology. Herausgeber K. Maramorosch u. H. Koprowsky, Academic Press N. Y. (1967).

Weissmann, C., Feix, G., Slor, H.: In vitro synthesis of phage RNA. The nature of the intermediates. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 83 - 100 (1968).

Zagorski, W., Filipowicz, W., Wodnar, A., Leonowicz, A., Zagorska, L., Szafranski, P.: The effect of magnesium-ion concentration on the translation of phage-f2 RNA in a cell-free system of Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 25, 315 - 322 (1972).

Zubay, G., Chambers, D. A.: A DNA-directed cell-free system for ß-galactosidase synthesis; characterization of the novo synthesized enzyme and some aspects of the regulation of synthesis. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 753 - 761 (1969).

Lebenslauf

22.8.1944	Geboren in Detmold
1951-1954	Volksschule in Hiddesen
1954-1955	Volksschule in Paderborn
1955-1959	Pelizaeus-Gymnasium in Paderborn
1959-1961	Gymnasium am Lerchenfeld in Hamburg
1961	Mittlere Reife
1961-1966	Technische Angestellteam Funkamt Hamburg
1964-1967	Staatliches Abendgymnasium in Hamburg-St. Georg
Febr. 1967	Abitur
SS 1967 - WS 1972/73	Biochemiestudium in Tübingen
ab WS 1969/70	Medizinstudium
WS 1971/72	Diplomprüfung in Biochemie
Mai 1972 - Januar 1973	Diplomarbeit im Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Melchers, unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. H. Jockusch. Thema der Arbeit: "Partielle Reinigung von Qß-Replicase im Halbmikromaßstab: Vergleich des Produkts zellfreier Proteinsynthese mit dem Enzym aus infizierten Zellen."
Februar 1973 - April 1974	Dissertation am Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. H. Jockusch. Thema der Arbeit: "Bildung aktiver Replicase nach zellfreier Translation der RNA des Coliphagen Qß".
Sept. 1973	Ärztliche Vorprüfung

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Dr. E. Bayer Dr. G. Kortüm Dr. H. Krüger

Dr. H. Mauser Dr. E. Müller Dr. W. Rüdorff

Dr. W. Seyffert Dr. F. Schneider Dr. Dr. G. Weitzel

Dr. U. Weser

und Herr Priv. Doz. Dr. H. Jockusch